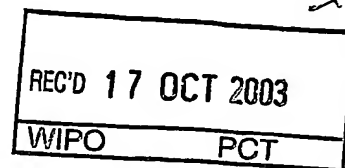


**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



#2

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

102 44 124.3

Anmeldetag:

23. September 2002

Anmelder/Inhaber:

Satia GmbH, Freising/DE;
Degussa AG, Trostberg/DE.

Bezeichnung:

Wasserhaltiges Medium mit erhöhter Viskosität,
Verfahren zur Herstellung und Verwendung

IPC:

C 08 J, C 12 S, A 23 C

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 14. August 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hintermeier

Best Available Copy

Satia GmbH
85354 Freising

Degussa AG
83308 Trostberg

Trostberg, 3. September 2002
Unser Zeichen: S-MS-IPM-PAT
Dr. Krö-hg
DHN 11

Wasserhaltiges Medium mit erhöhter Viskosität,
Verfahren zur Herstellung und Verwendung

Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein wasserhaltiges Medium mit erhöhter Viskosität, ein Verfahren zur Herstellung und die Verwendung des Mediums.

Texturierungssysteme spielen als Zusatzstoffe vor allem im Lebensmittel- und Kosmetikbereich eine wichtige Rolle und vermitteln den Mischungen, denen sie zugesetzt werden, die gewünschte Konsistenz. Von großer Bedeutung sind hierbei einerseits eine gezielte Erhöhung der Viskosität des Produktes sowie andererseits die Ausbildung von gelartigen Strukturen.

Ein Gel entsteht durch die Vernetzung zahlreicher Moleküle durch intermolekulare Wechselwirkungen. Dabei bildet sich ein dreidimensionales Netzwerk aus, in dem dann relativ große Mengen an Wasser gebunden werden können. Beispiele hierfür sind die Gelbildung von Pektinen in Gegenwart hoher Zuckerkonzentrationen oder nach der Zugabe von Ca^{2+} -Ionen bei der Konfitürenherstellung oder die Gelbildung von κ -Carrageenan in Gegenwart von K^{+} -Ionen.

Auf Grund eines zu geringen Molekulargewichtes oder der fehlenden Möglichkeit zur Gelbildung durch hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen sind viele Polysaccharide, wie z. B. Zuckerrübenpektin nicht oder nur schlecht zur Erhöhung der Viskosität oder zur Gelbildung geeignet. Hier sind neue Technologien gewünscht, mit deren Hilfe die beschriebenen Limitierungen überwunden werden können.

Wie sich in den letzten Jahren zeigte, enthalten zahlreiche Polysaccharide der Pflanzenzellwand, wie z. B. das Pektin in Zuckerrüben oder Arabinoxylane in Weizenkörnern, speziell als Zimtsäurederivate, phenolische Gruppen, die meist über Esterbindungen an diese Polymere gebunden sind. Diese phenolischen Gruppen können durch eine chemische oder enzymkatalysierte Reaktion miteinander reagieren. Durch die kovalente Bindung einer Vielzahl phenolischer Gruppen mehrerer

Polysaccharidmoleküle untereinander kann es schließlich zur Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes und somit auch zur Bildung eines Gels kommen.

Diesem Prinzip folgend wird gemäß US 4,672,034 ein Ferulasäure enthaltendes Zuckerrübenpektin mit Hilfe eines oxidierenden Systems aus zumindest einem oxidierenden Stoff und einem Enzym, für das dieser oxidierende Stoff ein Substrat darstellt, modifiziert und zur Gelbildung gebracht. Die dargestellten Systeme bestehen aus der oxidierenden Verbindung Wasserstoffperoxid und dem Enzym Peroxidase.

WO 96/03 440 beschreibt ein Verfahren zur Gelbildung oder zur Erhöhung der Viskosität einer wässrigen Lösung durch Zugabe des Enzymes Laccase aus Mikroorganismen zu einem gelierbaren polymeren Stoff, der Substituenten mit phenolischen Gruppen besitzt. Auch wird eine enzymatische Vorbehandlung zur Entfernung eines Teils der Arabinose-Gruppen aus dem Polymer vor der enzymatischen Quervernetzung zur Verbesserung der Gelbildung vorgeschlagen. Weiterhin wird die Trocknung oder Dehydratation des Gels und die Verwendung des getrockneten Produktes als Adsorbens für wässrige Flüssigkeiten beschrieben.

In WO 97/27 221 ist eine Methode zur Gelbildung oder zur Erhöhung der Viskosität einer wässrigen Lösung mit Hilfe eines gelierbaren Polymers mit phenolischen Gruppen (z. B. Zuckerrübenpektin) offengelegt. Die Gelbildung basiert hier auf der Zugabe einer Esterase (Pektinmethylesterase) und einer Oxidase (Laccase) oder Peroxidase in Gegenwart einer durch dieses Enzym oxidierbaren Substanz. Auch hier ist die Trocknung und die Verwendung des getrockneten Produktes dargelegt.

Norsker et al. (Food Hydrocolloids, 14, (2000), S. 237-43) beschreiben den Prozeß der enzymatischen Gelbildung von Zuckerrübenpektin in Lebensmitteln wie z. B. Säfte, Milch, Hackfleisch mit Hilfe von zwei verschiedenen Laccasen und einer Peroxidase. In den so behandelten

Lebensmitteln kommt es als Folge der Enzymreaktionen allerdings auch zu einer unerwünschten Bleichung der Anthocyane und zu sensorisch ungünstigen Fettoxidationen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur enzymatischen Gelbildung phenolhaltiger Polysaccharide bisher verschiedene Limitierungen insbesondere für Anwendungen in der Kosmetik und im Bereich der Lebensmittel aufweisen:

Peroxidasen sind für eine erfolgreiche Gelbildung auf die Zugabe einer oxidierenden Substanz, meist Wasserstoffperoxid, angewiesen. Bei längerer Reaktion kommt es durch diese Verbindung zu einer unerwünschten Hydrolyse der Polysaccharid-Ketten, was eine Zerstörung des gebildeten Gels nach sich zieht. Wasserstoffperoxid kann auch zu einer unerwünschten chemischen Oxidation der in kosmetischen Formulierungen oft vorhandenen Fette und Öle führen und eine Entstehung von ranzigen Aromen nach sich ziehen. Zudem darf Wasserstoffperoxid Lebensmitteln nicht direkt zugesetzt werden.

Laccasen kommen in Pflanzen und Pilzen vor. Sie sind verantwortlich für den Auf- und Abbau des in Pflanzen vorhandenen Lignins. Für ihre Reaktion bedarf es keiner Zugabe einer zusätzlichen oxidierenden Verbindung, da sie in der Lage sind, phenolische Verbindungen in Gegenwart von Sauerstoff zu oxidieren. Allerdings können sie ausschließlich die Oxidation diphenolischer Verbindungen katalysieren. Monophenolische Verbindungen, wie z. B. Tyrosin, können sie nicht umsetzen.

Im Verlauf der Laccase-katalysierten Reaktion kommt es zu einem direkten Elektronentransfer von der zu reduzierenden phenolischen Verbindung auf Sauerstoff. Dabei entsteht ein Radikal, welches im Folgeschritt eine nichtenzymatische Reaktion eingehen und so zur Quervernetzung der Ferulasäure-haltigen Polysaccharide führen kann. Wie bereits dargelegt (Food Hydrocolloids, 14, (2000), S. 237-43), kann es im Verlauf der Reaktion des enzymatisch gebildeten radikalischen Produktes mit Lipiden aber auch zu einer Oxidation der ungesättigten Fettsäuren in Lebensmitteln und

kosmetischen Stoffen kommen, was dann zu dem bereits angesprochenen unerwünschten ranzigen Geschmacks- und Geruchseindruck führt.

Laccasen können aber auch zur enzymatischen Bleichung eingesetzt werden: In Lebensmitteln und kosmetischen Formulierungen verursacht die damit verbundene Reaktion allerdings oft einen nicht gewünschten Verlust der Farbgebung.

Gemäß Stand der Technik verbleiben die jeweils zur Quervernetzung eingesetzten Enzyme der Polysaccharide in aktiver Form im Endprodukt. Dadurch kann auf die Gelstärke und auch die Bildung der beschriebenen unerwünschten Nebenprodukte nur sehr wenig oder gar kein Einfluss genommen werden. Weiterhin ist ein Einsatz der genannten Enzyme in Lebensmitteln überwiegend nur dann zulässig, wenn sie im Endprodukt keine Wirkung mehr ausüben, d. h. nicht mehr in aktiver Form vorliegen.

Die Laccasen kommen in höherer Konzentration nur in Mikroorganismen vor, die zur Enzym-Gewinnung kultiviert werden müssen. Die anschließende Isolierung des Enzyms erfordert einen nicht unerheblichen Aufwand für die Extraktion und die Aufreinigung über Fällungen, chromatographische Methoden usw.

Hinzu kommt, dass Laccasen insbesondere in Gegenwart höherer Protein- oder Salzkonzentrationen mit den phenolischen Gruppen von Zuckerrübenpektin keine oder nur sehr schwache Gele ausbilden können.

Polyphenoloxidasen weisen im Gegensatz zu den Laccasen (p-Diphenoloxidasen; EC 1.10.3.2) sowohl eine Monophenolase- als auch eine Diphenolase-Aktivität auf. Sie kommen in höherer Konzentration in Pflanzen vor und dienen dort u. a. der Abwehr von Mikroorganismen durch Bildung polyphenolischer Verbindungen.

Die Polyphenoloxidasen vereinen also zwei verschiedene Enzymaktivitäten: Zum einen eine Monophenolase-Aktivität, die die o-Hydroxylierung eines Monophenols zum o-Diphenol katalysiert und die diese Enzyme von

anderen phenoloxidierenden Enzymen wie Peroxidase oder Laccase unterscheidet. Zum anderen besitzen die Polyphenoloxidasen eine Diphenolase-Aktivität, die eine Oxidation von zwei o-Diphenolen zu zwei o-Dichinonen und die gleichzeitige Reduktion eines Sauerstoffmoleküls katalysiert.

Im Gegensatz zu Laccasen führt der Reaktionsschritt der Oxidation des Diphenols bei Polyphenoloxidasen nicht zu einem radikalischen Endprodukt der Enzymreaktion, weshalb es nicht zu den von der Laccase- und Peroxidasereaktion bekannten unerwünschten Nebenreaktionen, wie Fettoxidation oder Bleichung kommt.

Polyphenoloxidasen, wie z. B. die bekannte Tyrosinase [EC 1.14.18.1], kommen in Früchten, Knollen oder Blättern in höheren Konzentrationen vor, so dass sie vereinzelt auch ohne Extraktion oder Aufreinigung für technologische Prozesse, z. B. bei der Teefermentation zur Herstellung von "Schwarzem Tee", genutzt werden.

Auch in vielen Nebenprodukten, die bei der Lebensmittel-Verarbeitung anfallen und die bisher nicht genutzt werden, finden sich in höheren Konzentrationen Tyrosinasen. So können hohe Tyrosinase-Aktivitäten im Fruchtwasser von Kartoffeln, einem Nebenprodukt der Kartoffelstärkproduktion, nachgewiesen werden. Meist reicht die Abtrennung der Stärke und der Faserbestandteile der Kartoffel aus, um einen Extrakt mit einer für die enzymatische Quervernetzung von Zuckerrübenpektin ausreichenden Tyrosinase-Aktivität zu erhalten.

Ausgehend von diesem Kenntnisstand hat sich für die vorliegende Erfindung die Aufgabe gestellt, ein wasserhaltiges Medium mit erhöhter Viskosität, enthaltend eine mit Hilfe von Oxidasen modifizierte gelierfähige Polymer-Komponente mit phenolischen Substituenten bereitzustellen, ein Verfahren zur Herstellung eines Mediums und dessen Verwendung.

Im Vordergrund stand dabei vor allem die Kontrolle der Enzymreaktion zur Ausbildung einer definierten Viskosität oder eines Geles definierter

Gelstärke sowie die Vermeidung einer enzymatisch bedingten Bildung unerwünschter Nebenprodukte im Endprodukt.

Gelöst wurde diese Aufgabe mit einem entsprechenden Medium bei dem die Modifizierung durch

- a) ein Protein mit Polyphenoloxidase-Aktivität und/oder
- b) eine Enzym-Mischung enthaltend Hydrolasen, Oxidoreductasen und Peroxidasen

erfolgte.

Mit diesem Medium konnten die gestellten Aufgaben voll erfüllt werden: Die erhöhte Viskosität kann durch die enzymatische Modifizierung tatsächlich gezielt eingestellt und ohne Nachreaktion stabil gehalten werden. Zudem weisen die erfindungsgemäßen Medien keine der sonst nachteiligen Nebenprodukte auf. Völlig überraschend hat sich mit dem beanspruchten wasserhaltigen Medium aber gezeigt, dass die Viskositätssteigerung im Medium oder die damit einhergehende Gel-Bildung so exakt vorherbestimmt und im gewünschten Ausmaß auch über längere Zeit stabil beibehalten werden können, dass diese Medien nun auch ihnen bislang völlig fremden Anwendungsgebieten zugänglich sind. Darüber hinaus ist die gewünscht eingestellte, ursprüngliche Gelstärke reproduzierbar: So kann das erfindungsgemäße wasserhaltige Medium ohne Weiteres problemlos getrocknet und anschließend selbst nach einer längeren Lagerzeit zum Gel mit der ursprünglichen Ausprägung rehydratisiert werden.

Das gelförmige Medium kann aber auch eingefroren und wieder aufgetaut werden, ohne dass es zu einem signifikanten Wasseraustritt oder einer Zerstörung der Gelstruktur kommt. Schließlich kann das gebildete Gel auf Temperaturen bis über 100 ° C erhitzt werden, ohne dass sich dabei die Struktur oder das Wasserbindungsvermögen entscheidend ändern.

Dies war in dieser Ausprägung nicht vorhersehbar.

Nicht zuletzt aus diesem Grund sieht die vorliegende Erfindung vor, dass es sich beim erfindungsgemäßen Medium bevorzugt um ein Gel und besonders bevorzugt um ein Gel im (teil-)getrockneten und/oder (teil-)rehydratisierten Zustand handelt.

Wie bereits angesprochen, sind die besonderen Vorteile der beanspruchten Modifizierung auch in der Polyphenoloxidase-Aktivität zu sehen, weshalb es als vorteilhaft anzusehen ist, wenn die Polymer-Komponente monophenolische Substituenten trägt.

In diesem Zusammenhang sieht die vorliegende Erfindung vorzugsweise auch ein Medium vor, dessen Polymer-Komponente mindestens ein Polysaccharid, insbesondere mit (un-)substituierten Zimtsäureester-Gruppen darstellt und das als Polysaccharid besonders bevorzugt ein Arabinoxylan und/oder ein Pektin enthält.

Besonders gute Eigenschaften zeigt das Medium gemäß vorliegender Erfindung, wenn die Pektin-Komponente aus Chenopodiaceen und insbesondere aus Zuckerrüben oder deren Pulpe stammt.

Die Erfindung sieht aber auch als besondere Variante ein Medium vor, das Pektin enthält, bei dem mindestens eine der Arabinose-Gruppen entfernt wurde, was vorzugsweise unter leicht sauren Bedingungen bei einem pH-Wert zwischen 6,0 und 7,5 erfolgt sein sollte und/oder mit Hilfe eines Enzyms, wofür besonders bevorzugt eine Arabinofuranosidase vorgesehen ist.

Die ebenfalls als bevorzugtes Polysaccharid berücksichtigte Arabinoxylan-Komponente kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung insbesondere aus Cerealien wie z. B. Mais oder Weizen und diesbezüglich vor allem aus Mehl oder Schrot stammen.

Hinsichtlich der Polymer-Komponente sind Varianten als bevorzugt anzusehen, die mit einer Polyphenol-Oxidase und hier besonders bevorzugt mit einer Tyrosinase modifiziert wurden.

Die dafür eingesetzte Polyphenol-Oxidase kann dabei insbesondere aus Pflanzen der Familie der Solanaceen und besonders bevorzugt aus Kartoffeln, aber auch aus Apfel, Aubergine, Chicoree, Banane, Avocado, Teestrauch oder auch aus Champignon stammen.

Alternativ oder ergänzend zur Modifizierung der Polymer-Komponente mit einem Protein mit Polyphenoloxidase-Aktivität sieht die Erfindung es als Wesentlich an, dass hierfür eine Enzym-Mischung eingesetzt wird. Besonders bewährt hat sich dabei eine Variante bei der die Modifizierung mit einer Enzym-Mischung durchgeführt wurde, die eine β -Galactosidase, Glucose-Oxidase, Peroxidase und/oder ggf. eine Katalase enthielt.

Wie bereits erwähnt, ist ein wichtiger Vorteil des erfindungsgemäßen wasserhaltigen Mediums darin zu sehen, dass es getrocknet und rehydratisiert werden kann, ohne dabei Qualitätseinbußen zu erleiden. Als bevorzugt ist deshalb auch ein Medium anzusehen, das einem Trocknungsprozess unterworfen wurde; dabei kann die Trocknung natürlich durch niedrige (Gefriertrocknung) aber auch durch erhöhte Temperaturen und in beiden Fällen auch im Vakuum erfolgen, was die Vorteile zusätzlich belegt.

Ebenfalls vorgesehen ist erfindungsgemäß ein Medium, in dem die in ihm enthaltenen Enzyme und besonders bevorzugt die für die Modifizierung verantwortlichen Enzyme, nämlich insbesondere Oxidoreductasen, Peroxidasen und/oder Hydrolasen, nach erfolgter Modifizierung in nicht aktiver Form vorliegen, weshalb sie vor allem keine technologische Wirkung mehr ausüben können.

Darüber hinaus haben sich Medien als besonders geeignet gezeigt, die Enzyme enthalten, die chemisch und/oder thermisch inaktiviert wurden.

Bei der Verwendung einer Tyrosinase als typische Polyphenoloxidase ist z. B. eine thermische Inaktivierung des Enzyms in einem Gel bei einer Temperatur von 95 °C für 15 min möglich; zur chemischen Inaktivierung der Tyrosinase genügt die Zugabe einer 1 %-igen Ascorbinsäure-Lösung oder die Zugabe von 1 % Ascorbinsäure zum getrockneten Gel bzw. zur getrockneten viskosen Lösung.

Neben dem wasserhaltigen und speziell modifizierten Medium selbst berücksichtigt die vorliegende Erfindung auch dessen Verwendung im Nahrungsmittelbereich, im Bereich der Kosmetik und/oder für pharmazeutische Zwecke, besonders bevorzugt als Texturierungsmittel, viskositätsaufbauendes Agents, Geliermittel, als Filmbildner, als rheologisches Zusatzmittel oder als Stabilisierungsmittel.

Das erfindungsgemäße Medium mit inaktivierten Enzymen kann somit ohne Weiteres Lebensmitteln und kosmetischen oder pharmazeutischen Produkten zur Erhöhung der Viskosität oder zur Bildung einer gelartigen Struktur zugegeben werden. Insbesondere bei diesen Anwendungen kann das Enzym(-Gemisch), im Gegensatz zu den bisher bekannten Varianten, durch die Inaktivierung der Enzym-Komponente nicht mehr zur Bildung unerwünschter Nebenprodukte führen.

Darüber hinaus wird von der vorliegenden Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung eines wasserhaltigen Mediums mit erhöhter Viskosität beansprucht, das dadurch gekennzeichnet ist, dass

- a) mindestens ein Teil einer gelierfähigen Polymer-Komponente mit phenolischen Substituenten in einem wässrigen Medium gelöst vorgelegt wird, dann
- b) der Lösung aus Stufe a) bei Raumtemperatur eine angelöste Oxidoreduktase und/oder Peroxidase und/oder Hydrolase und/oder Katalase pflanzlichen oder pilzlichen Ursprungs zugesetzt wird, anschließend

- c) die Lösung aus Stufe b) für mindestens 15 Minuten bei Temperaturen zwischen 15 und 60 °C gerührt wird, und schließlich
- d) ggf. die in der aus Stufe c) erhaltenen Lösung enthaltenen Enzyme thermisch und/oder chemisch inaktiviert werden.

Durch die Kombination der beanspruchten Verfahrensschritte wird gewährleistet, dass das so erhaltene Medium ebenfalls die Vorteile aufweist bzw. entfaltet, die bereits vorgestellt worden sind.

Dabei ist durch Verfahrensschritt d) fakultativ vorgesehen, die Enzym-Komponente zu inaktivieren. Alle Reaktionen des zugesetzten Enzym(-Gemisches) sind damit beendet. Die Viskosität des Mediums oder dessen Gelstärke ändert sich nicht mehr und auch die sonst unerwünschten Nebenreaktionen (Bleichung von Farbstoffen oder enzymatische Fettoxidationen) durch das zur Gelbildung eingesetzte Enzym(-Gemisch) können nicht mehr auftreten.

Als sehr vorteilhaft hat es sich gezeigt, wenn in Verfahrensstufe a) als Polymer-Komponente mindestens eine der Reihe Oligo- oder Polysaccharid-, Alkohol-, Lactat-, Glutamat-, Pektin- und ein Lactose-haltiges Medium, vorzugsweise Milch oder ein Milch-haltiges Medium vorgelegt wird.

Somit ist vorzugsweise die Verwendung von in Lebensmitteln enthaltenen Verbindungen vorgesehen, bei denen entweder im Verlauf einer Enzymreaktion Wasserstoffperoxid gebildet werden kann oder die zu Verbindungen umgesetzt werden können, bei denen während einer weiteren Enzymreaktion Wasserstoffperoxid gebildet werden kann. Die hierfür im Medium beanspruchten Polysaccharide (Hydrolasen und Oxidasen), Oligosaccharide (Hydrolasen und Oxidasen), Alkohole (Alkohol-Oxidase und Peroxidase), Lactat (Lactat-Oxidase und Peroxidase), Glutamat (Glutamat-Oxidase und Peroxidase) stehen für die Bildung von oxidierenden Substanzen zur Verfügung, wie sie für die enzymatische Gelbildung von Polysacchariden mit phenolischen Gruppen und zum

Einsatz dieser oxidierenden Verbindungen zur Viskositätserhöhung oder Gelbildung durch enzymatische Quervernetzung der phenolhaltigen Polysaccharide eingesetzt bzw. benötigt werden.

Als ebenfalls bevorzugt ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung anzusehen, wenn in Verfahrensstufe b) mindestens eine Galaktosidase, Glucose-Oxidase, Meerrettich-Peroxidase, Laccase oder Polyphenol-Oxidase zugesetzt wird.

Lactose wird zwar bereits vereinzelt mit Hilfe von β -Galactosidase aus Milch- oder Milchprodukten entfernt, da ein nicht unerheblicher Teil der Bevölkerung unter einer Laktoseunverträglichkeit leidet. Die im bevorzugt eingesetzten Medium Milch vorhandene Laktose liefert beim vorliegenden Verfahren, nach Umsetzung mittels β -Galaktosidase und Glukose-Oxidase, aber das für die Gelbildung mit Hilfe der Meerrettich Peroxidase benötigte Wasserstoffperoxid. Die Produkte dieser Enzymreaktion dienen im Verlauf der beschriebenen enzymatischen Reaktionskaskade somit als Hilfsstoffe für die Gelbildung. Man erreicht also zum ersten Mal mit dem vorgestellten Verfahren zwei Effekte: Zum einen wird die oft unerwünschten Laktose aus dem Lebensmittel entfernt, zum anderen erhält das Medium durch Gelbildung die gewünschte Texturierung.

Schließlich kann bei diesem Verfahren die aus Verfahrensstufe b) erhaltene Lösung - gegebenenfalls nach Zugabe weiterer gelierfähiger und gegebenenfalls modifizierter Polymere - mindestens einem Trocknungsschritt unterzogen werden. Dabei kann das aus dem Trocknungsschritt erhaltene Pulver gemäß vorliegender Erfindung auch rehydratisiert werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist in einem wasserhaltigen Medium mit erhöhter Viskosität zu sehen, das mit dem eben beschriebenen Verfahren herstellbar ist. Besonders bevorzugt wird dabei eine Variante, bei der die in ihm enthaltenen Enzyme und insbesondere die in Verfahrensstufe b) zugesetzten Enzyme in nicht aktivierter Form vorliegen.

Wie das ebenfalls beanspruchte wasserhaltige Medium selbst kann auch jedes nach diesem Verfahren erhaltene wasserhaltige Medium im Nahrungsmittelbereich, im Bereich der Kosmetik und/oder für pharmazeutische Zwecke, besonders bevorzugt als Texturierungsmittel, viskositätsaufbauendes Agents, Geliermittel, als Filmbildner, als rheologisches Zusatzmittel oder als Stabilisierungsmittel verwendet werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das erfindungsgemäße wasserhaltige Medium mit erhöhter Viskosität seine besonderen Vorteile darin besitzt, dass seine Viskosität oder Gelstärke gezielt eingestellt werden kann, dass die erhaltene Viskosität oder Gelstärke stabil und dauerhaft ist und dass das Medium die ursprüngliche Viskosität oder Gelstärke auch nach vorangegangener Trocknung und Rehydratisierung wieder stabil und reproduzierbar aufbaut. Daneben ist das erfindungsgemäße Medium frei von unerwünschten Nebenprodukten, da die zur Modifizierung eingesetzten oder auch alle anderen natürlich darin enthaltenen oder künstlich zugesetzten Enzyme inaktiviert werden können, wobei sich der jeweilige Inaktivierungsschritt keinesfalls negativ auf die Viskosität bzw. die Gelstärke des Mediums auswirkt.

Im Hinblick auf Applikationen im Lebensmittel- oder Kosmetikbereich, wo nicht zuletzt auch der Einfluss der Matrix, d. h. der im Produkt befindlichen Inhaltsstoffe wie Proteine, Salze, Fette oder Zucker auf die Gelbildung von großer Bedeutung ist, hat sich gezeigt, dass die mit Polyphenoloxidasen gebildeten Gele insbesondere in Gegenwart höherer Salz- und Proteinkonzentrationen wesentlich besser sind als vergleichbare und mit Hilfe von Laccasen erhaltene Gele.

Die nachfolgenden Beispiele verdeutlichen die ausgeprägten Vorteile der vorliegenden Erfindung.

Beispiele

Beispiel 1

Quervernetzung des Mediums mit Tyrosinase und Trocknung sowie Rehydratisierung des erhaltenen Pulvers

0,75 g Pektin wurden in 25 ml 60 °C warmem Wasser eingerührt und vollständig gelöst. Dann wurde der pH-Wert der Lösung mit 0,1 M NaOH auf pH 6,0 eingestellt und 1 mg Tyrosinase (Sigma T-7755) zugegeben, die zuvor in 1 ml 100 mM H_2NaPO_4 -Puffer (pH 6,5) gelöst worden war. Die Reaktions-Lösung wurde im Wasserbad zunächst für 3 h in einem abgedeckten Gefäß bei 50 °C und danach für 20 h bei 20 °C stehen gelassen und anschließend bei – 18 °C Gel eingefroren. In der Gefriertrocknungsanlage wurde bei 0,1 hPa getrocknet. 0,3 g des getrockneten Pulvers wurden anschließend in 10 ml 60 °C warmem Wasser gelöst.

Als Vergleich diente eine Reaktions-Lösung ohne Tyrosinase. Die Gelstärke der verschiedenen Proben mit/ohne Tyrosinase wurde mit einem Texture Analyser TA-XT2 (Stable Microsystems) mit einer Sonde P20 (20 mm) und einem zylindrischen Sensor, Aluminium 5 kg, bei einer Geschwindigkeit von 3 mm/sec und einem Weg von 5 mm gemessen. Die Gele befanden sich in Kristallisierschalen mit einem Durchmesser von 50 mm. Tabelle 1 zeigt die Abhängigkeit der Kraft F von der Enzymkonzentration.

Tabelle 1

Abhängigkeit der Gelstärke (Kraft F) von der Enzymkonzentration
(Konzentration Zuckerrübenpektin 3 %; pH 6)

Enzymkonzentration [mg/25 ml]	0 (Vergleich)	0,4	0,7	1,0
Kraft [g]	kein Gel	8	39	269

Beispiel 2**Quervernetzung des Mediums mit Tyrosinase aus Kartoffeln**

Zur Extraktion der Tyrosinase aus Kartoffeln wurde 1 kg Kartoffeln entsaftet (Entsafter AFK, Aachen), der Kartoffelsaft bei 4000 U/min für 20 min zentrifugiert und der Überstand über Schwarzbandfilter filtriert. In 25 ml des so erhaltenen Filtrats wurden 0,75 g Zuckerrübenpektin unter Rühren bei 50 °C gelöst. Nachdem die nach 3 h bei 20 °C eingesetzte Gelbildung beendet war wurde das Gel bei - 18 °C eingefroren und in der Gefriertrocknungsanlage bei 0,1 hPa getrocknet. Schließlich wurden 0,3 g des getrockneten Pulvers in 10 ml 60 °C warmem Wasser gelöst.

Beispiel 3

**Quervernetzung des Mediums mit β -Glukosidase/Glukose
Oxidase/Meerrettichperoxidase-Mischung und Trocknung sowie
Rehydratisierung des erhaltenen Pulvers**

0,75 g Pektin und 3,5 mg Laktose wurden in 25ml 60 °C warmem Wasser eingerührt und vollständig gelöst. Dann wurde der pH-Wert der Lösung mit 0,1 M NaOH auf pH 6,0 eingestellt und 5 μ g β -Galaktosidase (Sigma G-6160), 250 μ g Glukose Oxidase (Sigma G-7016) sowie 1 mg Peroxidase (Sigma P-6782) zugegeben, die zuvor zusammen in 1ml 100 mM H_2NaPO_4 -Puffer (pH 6,5) gelöst worden waren. Die Reaktions-Lösung wurde dann 1 h bei 20 °C stehen gelassen und das entstandene Gel bei - 18 °C Gel eingefroren. In der Gefriertrocknungsanlage wurde bei 0,1 hPa getrocknet. 0,3 g des getrockneten Pulvers wurden anschließend in 10 ml 60 °C warmem Wasser gelöst.

Beispiel 4

Quervernetzung des Mediums mit Laccase, thermische Inaktivierung des Enzyms sowie Trocknung und Rehydratisierung des erhaltenen Pulvers (Vergleich)

0,375 g Pektin wurden in 25 ml 60 °C warmem Wasser eingerührt und vollständig gelöst. Dann wurde der pH-Wert der Lösung mit 0,1 M NaOH auf pH 5,0 eingestellt und 0,2 mg Laccase C (ASA Enzyme, Best. Nr. 2020), die zuvor in 1ml Wasser gelöst worden waren, zugegeben. Die Reaktions-Lösung wurde 24 h bei 20 °C stehen gelassen und dann die Laccase durch Erhitzen des Gels für 20 min auf 90 °C inaktiviert. Anschließend wurde das Gel bei – 18 °C eingefroren und dann in der Gefriertrocknungsanlage bei 0,1 hPa getrocknet. 0,3 g des getrockneten Pulvers wurden abschließend in 10 ml 60 °C warmem Wasser gelöst.

Beispiel 5

Quervernetzung des Mediums mit Tyrosinase und thermische Inaktivierung des Enzyms sowie Trocknung und Rehydratisierung des erhaltenen Pulvers

0,75 g Pektin wurden in 25 ml 60 °C warmem Wasser eingerührt und vollständig gelöst. Dann wurde der pH-Wert der Lösung mit 0,1 M NaOH auf pH 6,0 eingestellt und 1,2 mg Tyrosinase (Sigma T-7755) zugegeben, die zuvor in 1ml 100 mM H_2NaPO_4 -Puffer (pH 6,5) gelöst worden sind. Anschließend wurde in einem Wasserbad und in einem abgedeckten Gefäß zunächst bei 50 °C für mindesten 2 h und danach für 20 h bei 20 °C stehen gelassen und dann die Tyrosinase durch Erhitzen des Gels für 40 min auf 90 °C inaktiviert. Das Gel wurde dann bei – 18 °C Gel eingefroren und in der Gefriertrocknungsanlage bei 0,1 hPa getrocknet. Schließlich wurden 0,3 g des getrockneten Pulvers in 10 ml 60 °C warmem Wasser gelöst.

Beispiel 6

Quervernetzung des Mediums mit Meerettichperoxidase und thermische Inaktivierung des Enzymes sowie Trocknung und Rehydratisierung des erhaltenen Pulvers

0,5 g Pektin wurden in 25 ml 60 °C warmem Wasser eingerührt und vollständig gelöst. Dann wurde der pH-Wert Lösung mit 0,1 M NaOH auf pH 6,0 eingestellt und 1 ml einer Lösung von 5 mg Peroxidase (Sigma P-6782) zugegeben, die in 100 ml eines 100 mM H_2NaPO_4 -Puffers (pH 6,5) gelöst worden waren. Nach Zugabe von 6 µl einer 3 % H_2O_2 Lösung wurde 10 s gerührt, 1 h bei 20 °C stehen gelassen und die Peroxidase durch Aufheizen des Gels für 40 min auf 90 °C inaktiviert. Anschließend wurde das Gel bei -18 °C Gel eingefroren und in der Gefriertrocknungsanlage bei 0,1 hPa getrocknet. Schließlich wurden 0,3 g des getrockneten Pulvers in 10 ml 60 °C warmem Wasser gelöst.

Beispiel 7

Quervernetzung von pflanzlichen Extrakten mit Laccase (Vergleich)

3,5 g einer getrockneten Zuckerrübenpulpe wurde in 100 ml Wasser gegeben und der pH-Wert der Mischung mit HNO_3 (28%-ig) auf pH 2 eingestellt. Dann wurde 15 h bei 70 °C gerührt, der pH-Wert mit 10 N NaOH auf einen Wert von 3,3 eingestellt und 20 min bei 20 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dialysiert:

Dialyse Schlauch Ø 48mm; 18 ml/cm; MWCO 12.000-14.000; äußere Phase: 1 800 ml Wasser pH 3,5 (eingestellt mit HNO_3), 20 h; 20 °C; äußere Phase: 5 000 ml Wasser pH 3,5, 22 h; 20 °C.

Das Dialysat wurde dann bei 50 °C und 80 hPa auf einen Trockenmassegehalt von 3 % aufkonzentriert bevor zu 25 ml dieser Lösung 0,2 mg einer in 1 ml Wasser gelösten Laccase C (ASA Enzyme, Best. Nr. 2020) geben wurden. Es wurde dann 24 h bei 20 °C stehen gelassen.

Beispiel 8

Quervernetzung von pflanzlichen Extrakten mit Peroxidase

3,5 g getrockneter Reste aus der Zuckerrübenextraktion wurden in 100 ml Wasser geben und der pH-Wert dieser Mischung mit HNO_3 (28%-ig) auf pH 2,0 eingestellt. Dann wurde 15 h bei 70 °C gerührt und der pH-Wert mit 10 N NaOH auf pH 3,3 eingestellt, 20 min bei 20 °C und 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand bei 50 °C und 80 hPa auf einen Trockenmassegehalt von 3 % aufkonzentriert. Zu 25 ml dieser Lösung wurden 0,25 mg einer in 1 ml Wasser gelösten Peroxidase (Sigma P-6782) und 6 µl einer 3 %igen H_2O_2 Lösung gegeben und das Gemisch 24 h bei 40 °C stehen gelassen.

Beispiel 9

Bildung eines Gels durch Zugabe eines Apfelpresseextraktes zu Zuckerrübenpektin

200 g Äpfel wurden im Entsafter (Braun Modell 201) ausgepresst und der Presssaft am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck (40 hPa) bei 40 °C auf einen Trockenmassegehalt von 20 % einrotiert. Zu 20 ml dieses aufkonzentrierten Presssaftes wurden 10 ml einer 4 %igen Zuckerrübenpektin-Lösung gegeben gerührt und 24 h bei 40 °C stehen gelassen.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die unterschiedlichen relativen Gelstärken von Vergleichs-Medien aus Beispiel 4 (Laccase) und erfindungsgemäßen Medien aus Beispiel 5 (Tyrosinase):

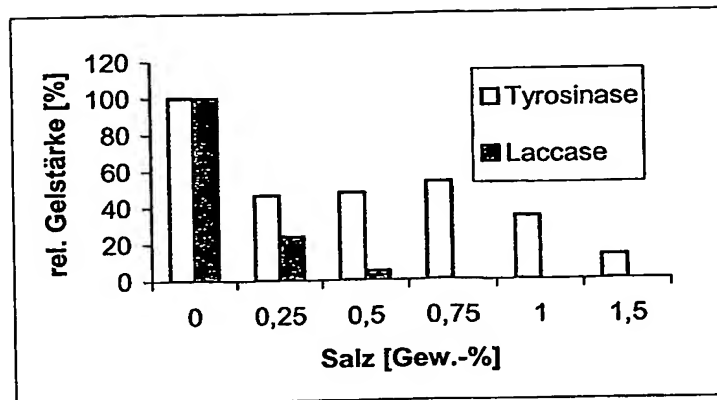


Abbildung 1

Vergleich der relativen Gelstärken von Tyrosinase und Laccase in Gegenwart verschiedener Salzkonzentrationen (NaCl)

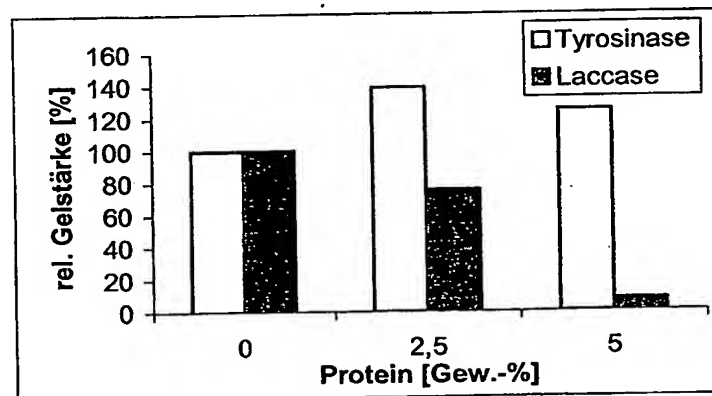


Abbildung 2

Vergleich der relativen Gelstärken von Tyrosinase und Laccase in Gegenwart verschiedener Proteinkonzentrationen (Rinderserumalbumin)

Patentansprüche

1. Wasserhaltiges Medium mit erhöhter Viskosität, enthaltend eine mit Hilfe von Oxidasen modifizierte gelierfähige Polymer-Komponente mit phenolischen Substituenten, dadurch gekennzeichnet, dass die Modifizierung durch
 - a) ein Protein mit Polyphenoloxidase-Aktivität und/oder
 - b) eine Enzym-Mischung enthaltend Hydrolasen, Oxidoreduktasen und Peroxidasenerfolgte.
2. Medium nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein Gel und besonders bevorzugt im (teil-)getrockneten und/oder (teil-)rehydratisierten Zustand handelt.
3. Medium nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymer-Komponente monophenolische Substituenten trägt.
4. Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymer-Komponente mindestens ein Polysaccharid, insbesondere mit (un-)substituierten Zimtsäureester-Gruppen darstellt.
5. Medium nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es als Polysaccharid ein Arabinoxylan und/oder ein Pektin enthält.
6. Medium nach einem der Ansprüche 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Pektin-Komponente aus Chenopodiaceen und insbesondere aus Zuckerrüben oder deren Pulpe stammt.

7. Medium nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es Pektin enthält, bei dem mindestens eine der Arabinose-Gruppen entfernt wurde, vorzugsweise unter leicht sauren Bedingungen bei einem pH-Wert zwischen 6,0 und 7,5 und/oder mit Hilfe eines Enzyms und besonders bevorzugt mit Hilfe einer Arabinofuranosidase.
8. Medium nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Arabinoxylan-Komponente aus Cerealien wie z. B. Mais oder Weizen und insbesondere aus Mehl oder Schrot stammt.
9. Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymer-Komponente mit einer Polyphenol-Oxidase und besonders bevorzugt mit einer Tyrosinase modifiziert wurde.
10. Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Polyphenol-Oxidase aus Pflanzen der Familie der Solanaceen und besonders bevorzugt aus Kartoffeln, aus Apfel, Aubergine, Chicoree, Banane, Avocado, Teestrauch oder Champignon stammt.
11. Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Modifizierung mit einer Enzym-Mischung enthaltend eine β -Galactosidase, Glucose-Oxidase, Peroxidase und ggf. eine Katalase erfolgte.
12. Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass es einem Trocknungsprozess unterworfen wurde.
13. Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die in ihm enthaltenen Enzyme und besonders bevorzugt die für die Modifizierung verantwortlichen Enzyme, insbesondere Oxidoreduktasen, Peroxidasen und/oder Hydrolasen, nach erfolgter Modifizierung in nicht aktiver Form vorliegen.

14. Medium nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass es Enzyme enthält, die chemisch und/oder thermisch inaktiviert wurden.
15. Verwendung des wasserhaltigen Mediums nach einem der Ansprüche 1 bis 14 im Nahrungsmittelbereich, im Bereich der Kosmetik und/oder für pharmazeutische Zwecke, besonders bevorzugt als Texturierungsmittel, viskositätsaufbauendes Agents, Geliermittel, als Filmbildner, als rheologisches Zusatzmittel oder als Stabilisierungsmittel.
16. Verfahren zur Herstellung eines wasserhaltigen Mediums mit erhöhter Viskosität, dadurch gekennzeichnet, dass
 - a) mindestens ein Teil einer gelierfähigen Polymer-Komponente mit phenolischen Substituenten in einem wässrigen Medium gelöst vorgelegt wird, dann
 - b) der Lösung aus Stufe a) bei Raumtemperatur eine angelöste Oxidoreduktase und/oder Peroxidase und/oder Hydrolase und/oder Katalase pflanzlichen oder pilzlichen Ursprungs zugesetzt wird, anschließend
 - c) die Lösung aus Stufe b) für mindestens 15 Minuten bei Temperaturen zwischen 15 und 60 °C gerührt wird, und schließlich
 - d) ggf. die in der aus Stufe c) erhaltenen Lösung enthaltenen Enzyme thermisch und/oder chemisch inaktiviert werden.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass in Verfahrensstufe a) als Polymer-Komponente mindestens eine der Reihe Oligo- oder Polysaccharid-, Alkohol-, Lactat-, Glutamat-, Pektin- und ein Lactose-haltiges Medium, vorzugsweise Milch oder ein Milch-haltiges Medium vorgelegt wird.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass in Verfahrensstufe b) mindestens eine Galaktosidase, Glucose-Oxidase, Meerrettich-Peroxidase, Laccase oder Polyphenol-Oxidase zugesetzt wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die aus Verfahrensstufe b) erhaltene Lösung gegebenenfalls nach Zugabe weiterer gelierfähiger und gegebenenfalls modifizierter Polymere mindestens einem Trocknungsschritt unterzogen wird.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das aus dem Trocknungsschritt erhaltene Pulver rehydratisiert wird.
21. Wasserhaltiges Medium mit erhöhter Viskosität, herstellbar mit einem Verfahren nach den Ansprüchen 16 bis 20.
22. Medium nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die in ihm enthaltenen Enzyme und besonders bevorzugt die in Verfahrensstufe b) zugesetzten Enzyme in nicht aktiver Form vorliegen.
23. Verwendung des nach einem der Ansprüche 16 bis 20 erhaltenen wasserhaltigen Mediums im Nahrungsmittelbereich, im Bereich der Kosmetik und/oder für pharmazeutische Zwecke, besonders bevorzugt als Texturierungsmittel, viskositätsaufbauendes Agents, Geliermittel, als Filmbildner, als rheologisches Zusatzmittel oder als Stabilisierungsmittel.

Zusammenfassung

Vorgeschlagen wird ein wasserhaltiges Medium mit erhöhter Viskosität, das eine mit Hilfe von Oxidasen modifizierte gelierfähige Polymer-Komponente mit phenolischen Substituenten enthält, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die Modifizierung durch

- a) ein Protein mit Polyphenoloxidase-Aktivität und/oder
- b) eine Enzym-Mischung enthaltend Hydrolasen, Oxidoreduktasen und Peroxidasen

erfolgte. Bei dem entsprechend modifizierten Medium kann es sich um ein Gel, bevorzugt im (teil-)getrockneten oder (teil-)rehydratisierten Zustand handeln, dessen Viskosität bzw. Gelstärke gezielt eingestellt werden kann und selbst nach einem Trocknungsvorgang und einer Rehydratisierung die ursprüngliche Viskosität bzw. Gelstärke wieder stabil erreicht. Außerdem weist das wasserhaltige Medium keine Nebenprodukte auf, die sich negativ auf die Qualität des Gels bzw. auf dessen sensorische Eigenschaften auswirken. Neben dem wasserhaltigen Medium wird auch ein Verfahren vorgestellt, mit dem entsprechende Medien mit erhöhter Viskosität hergestellt werden und die auf den Einsatz von Oxidoreduktasen, Peroxidasen, Hydrolasen und/oder Katalasen zurückgreift. Als Anwendungsgebiet ist für die vorgestellten wasserhaltigen Medien der Nahrungsmittelbereich, der Bereich der Kosmetik und pharmazeutische Zwecke vorgesehen.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.